

Die Achse Umwelt-Erreger-Wirt bei übertragbaren und nicht übertragbaren Krankheiten: Jüngste Fortschritte in der experimentellen und klinischen Forschung

The environment-pathogen-host axis in communicable and non-communicable diseases: Recent advances in experimental and clinical research

Stefanie Gilles^{1,2},
Claudia Traidl-Hoffmann^{1,2}

(1) Institute of Environmental medicine,
UNIKA-T, Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München,
Germany

(2) CK-Care, Christine Kühne Center
for Allergy Research and Education,
Davos-Wolfgang, Schweiz

Zusammenfassung

Allergien und Autoimmunerkrankungen sind weltweit auf dem Vormarsch. Die Kontrolle von Infektionskrankheiten stellt jedoch auch im postantibiotischen Zeitalter eine Herausforderung dar. Chronische und/oder schwer kontrollierbare Infektionen treten bei Menschen mit Immunschwäche auf, wie z. B. bei HIV-Patienten, hospitalisierten Patienten, die multiresistenten Bakterien ausgesetzt sind, oder bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie. In einer alternden Bevölkerung drohen solche Erkrankungen an Bedeutung zuzunehmen. Gleichzeitig können Veränderungen der Umwelt, wie globale Erwärmung, Urbanisierung, zunehmende Umweltverschmutzung und neue Entwicklungen in der Lebensmitteltechnologie zu einer Veränderung in der Häufigkeit und Aggressivität von Allergenen führen. Veränderte Ernährungsgewohnheiten und möglicherweise auch der Einsatz von Antibiotika haben zudem einen Einfluss auf die Zusammensetzung der natürlichen mikrobiellen Flora von Darm, Atemwegen und Haut, was die Suszeptibilität für Erkrankungen wie Allergien, Asthma und Neurodermitis verändern könnte. Am kürzlich neu gegründeten Institut für Umweltmedizin der Technischen Universität München mit Sitz am UNIKA-T in Augsburg liegt der Schwerpunkt der experimentellen, klinischen und translationalen Forschung auf den komplexen Wechselwirkungen zwischen Umwelt, Erreger und Wirt in der Ausprägung oder Kontrolle von übertragbaren und nicht-übertragbaren Erkrankungen. Wir stellen hier unser Forschungskonzept vor und präsentieren unsere jüngsten Erkenntnisse auf dem Gebiet der Umwelt-Wirt-Interaktionen.

Summary

Allergies and autoimmune diseases are spreading worldwide. Control of infections, on the other hand, remains an issue, even in the post-antibiotic era. Chronic or poorly controlled infections occur in immune compromised individuals such as HIV patients,

hospitalized patients exposed to multi-resistant bacteria, or patients on immunosuppressive treatment. They may become an even more emerging issue in an ageing population. At the same time, profound environmental changes such as global warming, urbanization, increasing environmental pollution and novel food engineering technologies may alter the abundance or aggressiveness of allergens/allergen carriers in our environment. Likewise, changes in dietary habits – and possibly also use of antibiotics – have an impact on the composition of our natural microbial flora in the gut, airways and skin, which may alter susceptibility for common diseases, among them allergies, asthma and atopic eczema. At the recently founded Institute of Environmental Medicine of the Technische Universität Munich, located in Augsburg at the UNIKA-T, experimental, clinical and translational research is focused on the complex interactions of environment, pathogen and host in expression or control of communicable and non-communicable diseases. We present our research concept and recent findings in environment – host interactions.

Einleitung

Sowohl Allergene als auch Krankheitserreger treffen mit den Zellen unseres Immunsystems an denselben Grenzflächen des Körpers zusammen, nämlich zumeist an den Epithelien der Atemwege, des Magen-Darm-Trakts und der Haut. Im gesunden Organismus bilden Epithelien eine physikalische und immunologische Barriere gegen Mikroorganismen, Irritantien und Allergene. Die physikalische Barriere verhindert den Übertritt von Erregern ins subepitheliale Gewebe und besteht aus interzellulären Verknüpfungen (*tight junctions*), Mucus-sekretierender Schleimhaut und verhornten Epithelzellen. Die immunologische Barriere besteht aus antimikrobiellen Peptiden, Antigen-präsentierenden Zellen und *pattern recognition* Rezeptoren. Diese bewirken eine schnelle Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, welche dann ihrerseits das adaptive Immunsystem aktivieren. Tatsächlich ist das epitheliale Arsenal gegen eindringende Pathogene so umfangreich, dass es erstaunlich anmutet, dass es unter den sich konstant veränderten Umweltbedingungen die meiste Zeit unter Kontrolle gehalten wird. Die periphere Toleranz gegenüber „harmlosen“ Antigenen und unbedenklichen Kommensalen ist somit kritisch für den Erhalt der Integrität der epithelialen Barriere. Wird ein Erreger über seine Signatur von Gefahrensignalen erkannt, die am Expositionsort miteinander verrechnet werden, so führt dies zu einer fein abgestimmten Aktivierung der Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Ziel dieser konzertierten Aktion ist es, den Erreger zu eliminieren. Bleiben diese Bemühungen erfolglos, ist das Resultat chronische Entzündung und unkontrollierte Infektion. Auf der anderen Seite bewirkt eine unangemessene Aktivierung des Immunsystems Autoimmunität oder Allergie. Dies passiert z. B. wenn ein Selbstantigen oder ein eigentlich „harmloses“ Allergen fälschlicherweise als Erreger erkannt wird. Somit ist es ein gemeinsames Merk-

mal von unkontrollierter Infektion und Allergie, dass Signale, die Pathogene und Allergene an das Gewebe senden, vom Immunsystem missverstanden werden. Ein Schwerpunkt unserer Arbeit ist es daher, Mechanismen aufzudecken, welche bei umweltbedingten Erkrankungen die Gefahrenerkennung des Epithels und der assoziierten Immunzellen verändern. Diese Mechanismen werden durch verschiedene wirtsspezifische Faktoren beeinflusst, beispielsweise durch Mutationen in Genen des Immunsystems und der epithelialen Barriere, durch chronische Entzündungsprozesse, epitheliales Remodeling aufgrund chronischer Erkrankung, Faktoren des Lebensstils und der Ernährung sowie durch Geschlechtshormone. Es gibt jedoch auch extrinsische (Umwelt-) Faktoren, welche die komplizierte Balance zwischen Toleranz und Immunität stören. Daher haben wir es uns zur Aufgabe gemacht, die Achse zwischen Umwelt, Krankheitserreger/Allergen und dem Menschen umfassend zu analysieren.

Forschungskonzept zur Untersuchung der Achse Umwelt - Mensch

Die größte Herausforderung auf diesem Forschungsfeld besteht darin, Umwelt zu „messen“. Hierbei muss man die Umwelt ganzheitlich betrachten und als Summe aller physikalischen, biologischen und psychosozialen Einflüsse definieren [1]. Jüngste Fortschritte in der Umweltforschung bestanden beispielsweise darin, das biologische Exposom zu definieren, indem wir beispielsweise die Allergenkonzentration in verschiedenen Fraktionen der Außenluft sowie die mikrobielle Belastungen bestimmten [2]. Um jedoch die Interaktion zwischen Umwelt und Mensch im Detail zu erfassen, muss das Exposom mit dem Reaktom abgeglichen werden (Abbildung 1). Wir werden daher künftig versuchen, bei Allergen-exponierten Individuen Umweltfaktoren mit immunologischen Reaktionen

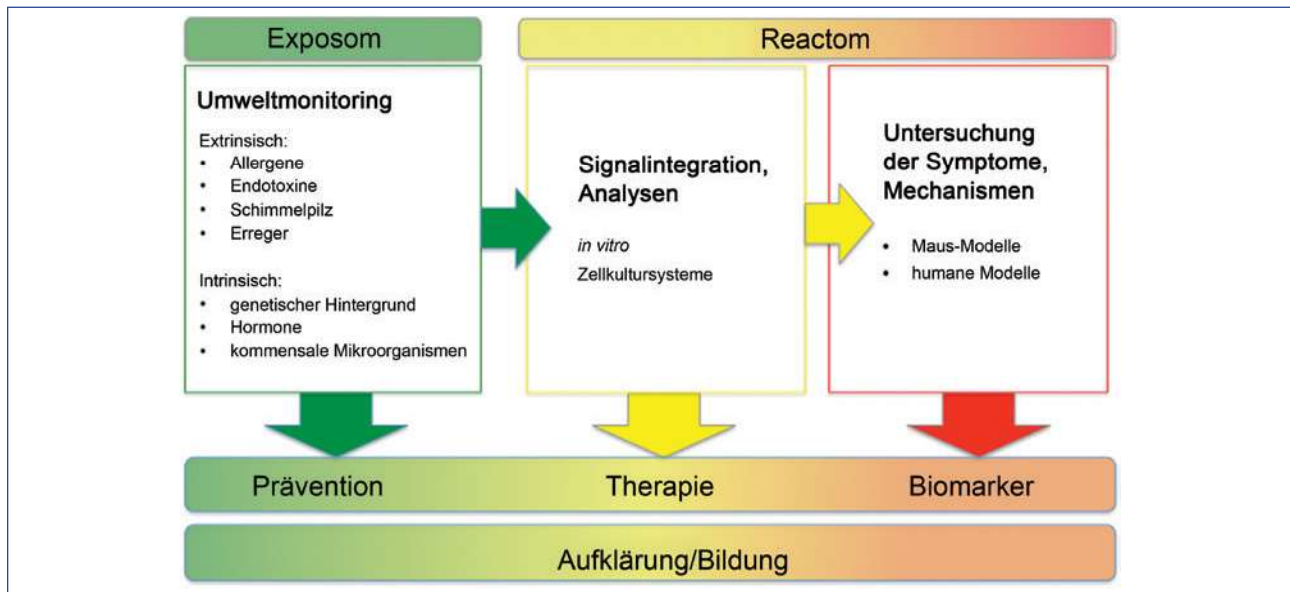


Abbildung 1 Forschungskonzept: Vom Exposom zum Reaktom. Das „Exposom“ eines Individuums besteht aus den extrinsischen und intrinsischen Umweltfaktoren. Zu den extrinsischen Faktoren gehören Schadstoffe, Allergene, Schimmelpilze, bakterielle Produkte und Krankheitserreger. Zu den intrinsischen Faktoren gehören genetischer Hintergrund, Hormone und kommensale Mikroorganismen. Wir werden sowohl für extrinsische als auch die intrinsische Umweltfaktoren ein Monitoring etablieren, um die identifizierten Faktoren anschließend einzeln und in Kombination in Zellkultursystemen zu untersuchen. Für die Beurteilung der klinischen Relevanz werden wir schließlich wieder auf Maus- und humane *in-vivo* Modelle zurückgreifen. Ziel wird es sein, aufzuklären, wie komplexe Umweltsignale integriert werden, welche die Gewebe-Homöostase sicherstellen oder zur Erkrankung führen. Dieser Forschungsansatz wird zur Entwicklung von Strategien zur Prävention und Edukation beitragen, krankheitsspezifische Biomarker identifizieren und neue Therapieoptionen aufzeigen.

und klinischen Symptomen zu korrelieren. Dieser Forschungsansatz wird es uns einerseits ermöglichen, Umweltfaktoren zu erkennen, die verantwortlich für die Zunahme von allergischen Erkrankungen sind, andererseits wird er protektive Umweltfaktoren identifizieren, die eine Toleranzinduktion oder -erhaltung fördern. Ein gutes Beispiel für diese Art von Forschung ist die Entdeckung der schützenden Wirkung eines Aufwachsens auf dem Bauernhof bei der Entwicklung bestimmter Allergien (*farming effect*) [3].

In den folgenden Abschnitten möchten wir einige Beispiele für erfolgreiche translationale und umweltbezogene Forschungsprojekte beschreiben.

Chronische mukokutane Candidose – Pathomechanismen einer seltenen, unkontrolliert verlaufenden Infektionskrankheit

Die chronische mukokutane Candidose (CMC) ist eine seltene angeborene Erkrankung, die durch wiederkehrende Infek-

tionen der oralen Mukosa, der Haut und der Nägel mit dem Pilzerreger *Candida albicans* charakterisiert ist. Letztlich führen diese chronischen Infektionen zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen [4]. Die Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich auf eine antimykotische Therapie, deren Wirksamkeit aber oftmals im Laufe der Zeit aufgrund der Entstehung von Resistenzen abnimmt.

Vor einigen Jahren hatten wir über veränderte T-Zell-Antworten auf *Candida*-Antigene in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) bei CMC-Patienten berichtet [5]. Auffallend ist, dass PBMCs von CMC-Patienten, die fungalen und mitotischen Stimuli ausgesetzt waren, weniger hautspezifische CCR6⁺ IL-17⁺ IL-22⁺-T-Zellen enthalten [6]. Bei gesunden Individuen wird eine *Candida*-Infektion von dem Immunsystem des Wirtes unter konstanter Kontrolle gehalten. Das Erkennen fungaler Zellwandkomponenten, insbesondere von β -Glucanen, durch die Pattern recognition Rezeptoren Dec-1 und TLR2 auf dendritischen Zellen löst eine Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen aus, darunter IL-1 β und IL-6. Diese Zytokine leiten, gemeinsam mit TGF- β , die STAT-3-abhängige Differenzierung von Th17-Zellen ein, die

als maßgebliche Akteure bei der Immunabwehr von Bakterien und Pilzen bekannt sind. Vor einigen Jahren wurde über eine vollständige Exom-Sequenzierung bei CMC-Patienten eine autosomal-dominante Gain-of-Function-Mutation des STAT-1-Gens identifiziert [7]. Die Mutation, so konnte gezeigt werden, hemmt die Dephosphorylierung und Inaktivierung des Transkriptionsfaktors im Zellkern. Eine Überaktivität von STAT-1 in T-Zellen wiederum verhindert die Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22, wodurch die Differenzierung von funktionellen Th17-Zellen beeinträchtigt ist. Bei der chronischen mukokutanen Candidose zeigt sich beispielhaft, wie ein wirtsspezifischer Defekt – in diesem Fall eine einzelne Mutation in einem für die T-Zell-Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor – ursächlich wird für die eingeschränkte Wahrnehmung von mikrobiellen Signalen. Das Ergebnis ist, dass die Infektion nicht kontrolliert werden kann, chronische Entzündung entsteht und es zu einer neoplastischen Transformation kommt. Dieses Beispiel veranschaulicht auch unseren klinischen Forschungsansatz: Ausgehend von definiertem Patientenmaterial analysieren wir die immunologischen und molekularen Signalwege des der Erkrankung zugrundeliegenden Phänotyps, um letztlich neuartige Therapieoptionen aufzeigen zu können.

Modulation der Pollenallergenität durch intrinsische, nicht-allergene Verbindungen und anthropogene Umweltfaktoren

Pollen von windbestäubten (amenophilen) Pflanzen sind die wichtigste Quelle von Allergenen in der Außenluft. Sie verursachen allergische Rhinitis, Asthma, Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien und, bei einigen Neurodermitis-Patienten, akute Ekzemschübe. Warum Pollenproteine eine Th2-dominierte, IgE-induzierte Immunantwort bei empfänglichen Individuen auslösen, wird noch nicht ausreichend verstanden. Der Umstand, dass Pollen einatembare Partikel sind und ihre Proteine zusammen mit zahlreichen anderen pflanzlichen Inhaltsstoffen, wie z. B. Proteasen und Oxidasen, freigesetzt werden, könnte einen Teil ihres allergenen Potenzial erklären. In unseren eigenen Arbeiten konnten wir auf die Bedeutung der Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) hinweisen [8]. Einige PALMs sind chemotaktisch für neutrophile und eosinophile Granulozyten [9, 10]. An ihrem Beispiel lässt sich zeigen, wie Pollenkörner dem angeborenen Immunsystems irreleitende Gefahrsignale aussenden. Andere PALMs, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit den Prostaglandinen aus Säugetierzellen aufweisen, modulieren dendritische Zellen, so dass diese eine Th2-gewichtete T-Zell Antwort induzieren und die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th-1-Zellen hemmen [11-13]. Darüber hinaus produzieren dendritische Zellen unter dem Einfluss der PALMs Chemoki-

ne, die vermehrt Th2-Zellen rekrutieren [14]. Auch in Mausmodellen konnte die Th1-hemmende Wirkung der PALMs und eine Mastzellaktivierung durch nicht-allergene Substanzen in Pollen gezeigt werden [15, 16]. Durch ein Screening des Birkenpollen-Metaboloms wurde Adenosin als weiterer aktiver Immunmodulator identifiziert [17]. Während die Funktion von Adenosin in der Pflanze bis heute unbekannt ist, konnten wir zeigen, dass Adenosin aus Pollen humane dendritische Zellen dazu befähigt, eine Differenzierung regulatorischer T-Zellen einzuleiten. Allerdings weisen dendritische Zellen von Pollen-Allergikern einen Defekt bei der Wahrnehmung dieses tolerogenen Signals auf und versagen bei der Induktion funktioneller Tregs als Antwort auf das Pollen-Adenosin; ein Beispiel, das zeigt, wie wirtsspezifische Eigenschaften die Wahrnehmung und Verarbeitung von Allergen-Signalen verändern.

In der Vergangenheit wurde der Frage, welchen Einfluss anthropogene Umweltfaktoren auf die Prävalenz und die Ausprägung von atopischen Erkrankungen hat, umfangreiche Forschung gewidmet. Wir hatten bereits gezeigt, dass ultrafeine Partikel, wie sie in Diesel-Abgasen vorkommen, allergisches Asthma in einem Mausmodell verstärken [18, 19]. Insgesamt gibt es eine solide Datenbasis dafür, dass industrielle und verkehrsbedingte Luftschadstoffe die Inzidenz atopischer Erkrankungen erhöhen und in ihrer Ausprägung verschärfen (Review in [20]). Allerdings wirken sich viele dieser Faktoren ebenso auf den Allergenträger, z. B. die pollenproduzierende Pflanze, aus. Wir konnten kürzlich zeigen, dass Pollen von Birken, die unter natürlichen Umweltbedingungen gewachsen sind, urbanisierungsbedingte Veränderungen in ihrem allergenen Potenzial aufweisen [21]. So wiesen Birkenpollen, die einer erhöhten Ozonkonzentration in der Außenluft ausgesetzt waren, einen geringeren Gehalt an immunmodulatorischen PALMs auf. Dagegen waren sie stärker chemotaktisch für Neutrophile, wiesen einen höheren Gehalt an Hauptallergen Bet v 1 auf und führten im Haut-Pricktest zu ausgeprägteren Immunreaktionen (wheal and flare reactions). Dies ist ein Beispiel dafür, wie sich anthropogene Umweltfaktoren direkt auf einen Allergenträger auswirken und damit indirekt die Manifestation einer allergischen Reaktion beim Menschen beeinflussen.

Interaktionen zwischen Umwelt, Erreger und Wirt bei komplexen Erkrankungen – Ausblick und Perspektiven

Die normale Immunreaktion auf kommensale Mikroben und Allergene ist Toleranz, während die normale Reaktion auf fungale, bakterielle und virale Erreger eine fein orchestrierte Immunantwort ist, die zu einer Beseitigung der Pathogene führt. Wie die hier aufgeführten Beispiele aus unserer klinischen und experimentellen Forschung zeigen, können

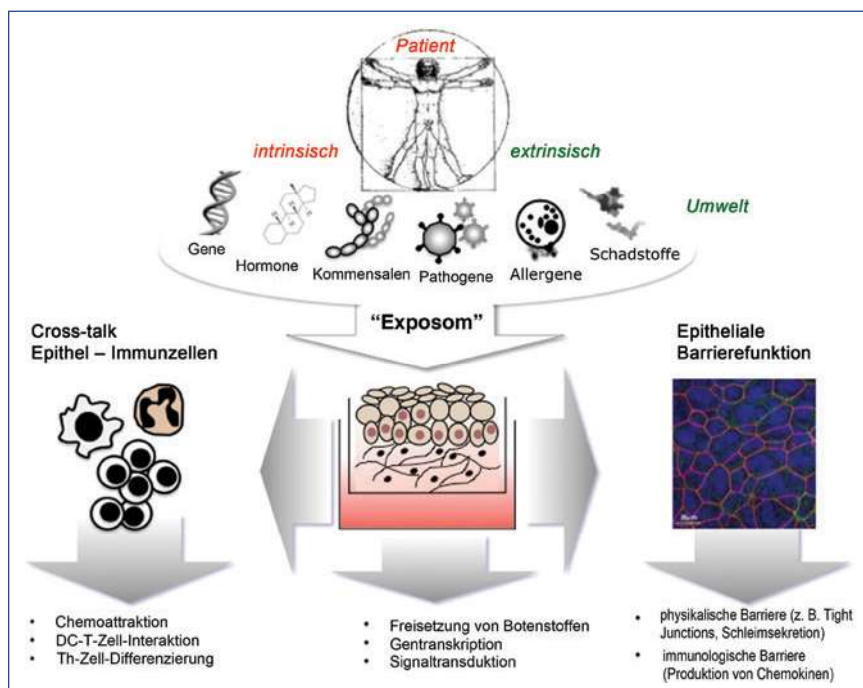


Abbildung 2 Workflow für die Analyse von Umwelt-Wirt-Interaktionen. Ausgehend von gut charakterisiertem Patientenmaterial werden wir intrinsische (und extrinsische) Umweltfaktoren definieren, die mit Krankheit assoziiert sind. Dieses so definierte „Exposom“ wird in vitro simuliert, indem Zellkulturen (z. B. 3D-Haut- und Atemwegsmodelle) stimuliert werden. Solche Modelle eignen sich für die detaillierte Analyse von Krankheitsmechanismen, z. B. der Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion und der Zell-Zell-Interaktion zwischen klassischen Immunzellen wie Granulozyten, dendritische Zellen und T-Zellen.

sowohl intrinsische als auch extrinsische Umweltfaktoren über die Induktion einer unangemessenen oder fehlerhaften Immunreaktion zu einer Erkrankung führen. Kommensale Mikroben fungieren als wichtige Regulatoren bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und der epithelialen Integrität. Eine zukünftige Strategie, um übertragbare und nicht-übertragbare Krankheiten zu studieren, könnte sein, mit gesunder Patientenhaut (oder Mukosa) zu beginnen, um deren spezifische mikrobielle Zusammensetzung zu definieren und die entsprechenden Mikroben zu isolieren und zu kultivieren. Im einem nächsten Schritt kann dann der Einfluss der mikrobiellen Zusammensetzung auf die Homöostase der Haut in vitro, unter Verwendung von Zellkulturen und Organkulturen (3D-Haut- und Atemwegsmodellen), sowie in Zell-Zell-Interaktionsmodellen (Epithelzellen – Dendritische Zellen – T-Zellen) analysiert werden (Abbildung 2).

Allergien sind komplexe, multifaktorielle Erkrankungen, welche durch genetische Prädisposition, Lebensstil-assoziierte- und Umweltfaktoren vermittelt werden. Einige Gene, z. B. FcεRI alpha und Filaggrin, wurden mit komplexen atopischen Erkrankungen wie Asthma oder Neurodermitis in Verbindung gebracht. Allerdings sind die meisten der entdeckten Assoziationen vergleichsweise schwach und können den schnellen Anstieg der Inzidenz in der Bevölkerung nicht erklären. Noch wird kaum verstanden, wie es beim Menschen zu einer Sensibilisierung kommt. Es wird eine Herausforderung für die Zukunft sein, ein individuelles „Exposom“ zu erstellen, z. B. im Sinne einer Gesamtexposition gegen-

über Allergenen, allergen-assoziierten und umweltbedingten Kofaktoren, um dann herauszufinden, wie sich dieses „Exposom“ in Toleranzentwicklung oder Sensibilisierung übersetzen lässt. Für die Zukunft planen wir, in einer populationsbasierten Kohorte allergiebezogene Fragen zu stellen und diese Daten mit Allergen-Messungen vor Ort abzugleichen. Schließlich werden wir unsere Forschung auf der Achse Umwelt-Allergen-Mensch durch die Analyse von Umweltfaktoren erweitern, die mit dem Klimawandel in Zusammenhang stehen, um herauszufinden, wie durch sie das allergene Potenzial von pollenproduzierenden Pflanzen beeinflusst wird.

Korrespondenzanschrift

Prof. Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann
Institute of Environmental Medicine
UNIKA-T
Neusässer Straße 47
86156 Augsburg
E-Mail: c.traidl-hoffmann@tum.de

Literatur

- 1 Ring J, Akdis C, Behrendt H et al. Davos declaration: allergy as a global problem. *Allergy* 2012; 67(2): 141–3.
- 2 Buters JT, Kasche A, Weichenmeier I et al. Year-to-year variation in release of Bet v 1 allergen from birch pollen: evidence for geographical differences between West and South Germany. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145(2): 122–30.

- 3 Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347(12): 869–77.
- 4 Eyerich K, Eyerich S, Hiller J et al. Chronic mucocutaneous candidiasis, from bench to bedside. *Eur J Dermatol* 2010; 20(3): 260–5.
- 5 Eyerich K, Rombold S, Foerster S et al. Altered, but not diminished specific T cell response in chronic mucocutaneous candidiasis patients. *Arch Dermatol Res* 2007; 299(10): 475–81.
- 6 Eyerich K, Rombold S, Foerster S et al. Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol* 2008; 128(11): 2640–5.
- 7 Liu L, Okada S, Kong XF et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 2011; 208(8): 1635–48.
- 8 Gilles S, Behrendt H, Ring J, Traidl-Hoffmann C. Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H)2-dominated response. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2009; 5(1): 3.
- 9 Plotz SG, Traidl-Hoffmann C, Feussner I et al. Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(6): 1152–60.
- 10 Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jakob T et al. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(5): 831–8.
- 11 Gilles S, Jacoby D, Blume C et al. Pollen-derived low-molecular weight factors inhibit 6-sulfo LacNAc+ dendritic cells' capacity to induce T-helper type 1 responses. *Clin Exp Allergy* 2010; 40(2): 269–78.
- 12 Gilles S, Mariani V, Bryce M et al. Pollen-derived E1-phytoprostanes signal via PPAR-gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms. *J Immunol* 2009; 182(11): 6653–8.
- 13 Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H et al. Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med* 2005; 201(4): 627–36.
- 14 Mariani V, Gilles S, Jakob T et al. Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction. *J Immunol* 2007; 178(12): 7623–31.
- 15 Gutermuth J, Bewersdorff M, Traidl-Hoffmann C et al. Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(2): 293–9.
- 16 Metz M, Gilles S, Geldmacher A et al. Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation. *J Invest Dermatol* 2011; 131(4): 987–90.
- 17 Gilles S, Fekete A, Zhang X et al. Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(2): 454–461 e1–9.
- 18 Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S et al. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(4): 824–30.
- 19 Alessandrini F, Weichenmeier I, van Miert E et al. Effects of ultrafine particles-induced oxidative stress on Clara cells in allergic lung inflammation. *Part Fibre Toxicol* 2010; 7: 11.
- 20 D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M. Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. *Eur Respir J* 2002; 20(3): 763–76.
- 21 Beck I, Jochner S, Gilles S et al. High environmental ozone levels lead to enhanced allergenicity of birch pollen. *PLoS One* 2013; 8(11): e80147.